

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|--|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 96/18740 (43) Date de publication internationale: 20 juin 1996 (20.06.96) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01650 | (74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction des Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). | |
| (22) Date de dépôt international: 12 décembre 1995 (12.12.95) | | |
| (30) Données relatives à la priorité: 94/15014 13 décembre 1994 (13.12.94) FR | | |
| (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). | (81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). | |
| (72) Inventeurs; et | Publiée | |
| (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FINIELS, Françoise [FR/FR]; 9, rue Bausset, F-75015 Paris (FR). GIMENEZ-RIBOTTA, Minerva [FR/FR]; 474, avenue de la Justice-de-Castenu, F-34000 Montpellier (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). PRIVAT, Alain [FR/FR]; 300, rue des Graves, F-34980 Saint-Clément-de-Rivière (FR). REVAH, Frédéric [FR/FR]; 49, rue de Chatenay, F-92160 Antony (FR). | Avec rapport de recherche internationale. | |

(54) Titre: ADENOVIRAL-VECTOR-MEDIATED GENE TRANSFER INTO MEDULLARY MOTOR NEURONS

(54) Titre: TRANSFERT DE GENES DANS LES MOTONEURONES MEDULLAIRES AU MOYEN DE VECTEURS ADENOVIRAUX

(57) Abstract

The use of recombinant adenoviruses for transferring nucleic acids into medullary motor neurons is disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne l'utilisation d'adénovirus recombinants pour le transfert d'acides nucléiques dans les motoneurones médullaires.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| RJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Bresil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Belarus | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | | | SE | Suède |
| CH | Suisse | KR | République de Corée | SI | Slowénie |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kazakhstan | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LI | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TT | Trinité-en-Tobago |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | MG | Madagascar | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | ML | Mali | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | MN | Mongolie | VN | Viet Nam |
| GA | Gabon | | | | |

Transfert de gènes dans les motoneurons médullaires au moyen de vecteurs adénoviraux

La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique. Elle concerne plus particulièrement une nouvelle méthode de traitement des pathologies du système nerveux par transfert de gènes dans les motoneurons médullaires au moyen de vecteurs adénoviraux.

La thérapie génique et l'utilisation de virus modifiés comme vecteurs pour les maladies neurodégénératives constituent des nouvelles approches thérapeutiques particulièrement prometteuses. Parmi les virus utilisés à cet effet dans l'art antérieur, on peut citer en particulier les adénovirus (Le Gal La Salle et al., Science 259, 988-990), les virus de l'herpès, les virus adéno-associés et les rétrovirus. Les études décrites dans l'art antérieur montrent que ces vecteurs, et en particulier les adénovirus, sont capables d'infecter avec une très grande efficacité les cellules du système nerveux central. Ces résultats permettent ainsi de mettre au point des méthodes de traitement des pathologies du système nerveux central par injection directe au niveau du système nerveux central (en particulier par stéréotaxie) d'adénovirus recombinants comprenant un gène thérapeutique.

Concernant la moelle épinière, dans le cadre de certaines maladies neurodégénératives ou de traumatismes, la thérapie génique pourrait également permettre de lutter contre la dégénérescence des neurones moteurs (motoneurons) en apportant certains gènes codant par exemple pour des facteurs de croissance. Néanmoins, ces applications sont encore limitées par l'absence de méthode simple permettant de transférer spécifiquement un gène au niveau de la moelle. La présente invention permet de remédier à ce problème.

La présente invention décrit en effet une méthode particulièrement efficace pour le transfert sélectif de gènes dans la moelle. La présente invention découle en particulier de la démonstration qu'il est possible de transférer spécifiquement un gène au niveau des motoneurons par administration, au niveau du muscle, d'un vecteur adénoviral incorporant ledit gène. En effet, la demanderesse a maintenant montré que, de manière particulièrement avantageuse, les adénovirus sont absorbés au niveau des jonctions neuromusculaires (plaques motrices), et acheminés jusqu'aux corps cellulaires des motoneurons (corne ventrale de la moelle épinière) par transport rétrograde à long des

axones motoneuronaux. L'administration intramusculaire de vecteurs adénoviraux selon l'invention constitue ainsi une nouvelle méthode très spécifique d'infection des motoneurons par transport rétrograde, permettant de cibler de façon précise l'étage médullaire sur lequel on désire intervenir en fonction de la localisation du traumatisme et/ou de la dégénérescence.

Le procédé selon la présente invention est tout particulièrement avantageux puisqu'il permet, en suivant une cartographie précise des jonctions neuromusculaires, d'infecter de façon spécifique et unilatérale les motoneurons des différents étages fonctionnels médullaires. Il s'avère de plus beaucoup moins traumatique qu'une injection stéréotaxique dans le parenchyme médullaire, laquelle serait de toutes façons plus diffuse et non restrictive aux motoneurons.

Un premier objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurons médullaires par administration intramusculaire.

Comme indiqué ci-avant, le procédé selon la présente invention est très avantageux puisqu'il permet de cibler précisément les motoneurons de chaque étage fonctionnel médullaire. Ainsi, selon le site de l'altération à traiter, l'administration est pratiquée dans un muscle portant une liaison nerveuse avec ledit site. Selon la présente invention, il est maintenant possible, par un choix judicieux de diverses injections, d'infecter, de façon spécifique et unilatérale, un grand nombre de motoneurons médullaires répartis sur les différents niveaux. A titre de mode de réalisation préférés, l'administration dans des muscles des membres supérieurs (biceps, triceps) permet de transférer un gène dans les motoneurons au niveau cervical; l'administration dans des muscles du thorax (pectoraux) permet de transférer un gène dans les motoneurons au niveau thoracique; ou encore l'administration dans des muscles des membres inférieurs (gastrocnémien) permet de transférer un gène dans les motoneurons au niveau lombaire et sacré. D'autres muscles peuvent bien entendu être utilisés pour l'administration au niveau de ces motoneurons, et d'autres motoneurons peuvent également être ciblés. A cet effet, il est possible d'utiliser des cartographies précises des jonctions neuromusculaires afin de déterminer, en fonction de l'étage médullaire ciblé, le ou les muscles les plus appropriés pour l'administration. De telles cartographies sont accessibles à l'homme de l'art (voir notamment Nicholopoulos et al., J. Comp. Neurol. 217, 78-85; Peyronnard et Charon, Exp. Brain Res. 50, 125-132). Selon l'étage

médullaire qu'il s'avèrera opportun d'infecter un ou plusieurs muscles connus pour être innervés par l'étage en question peuvent ainsi être choisis.

L'administration intramusculaire d'adénovirus peut être réalisée de différentes manières. Selon un premier mode de réalisation, elle est pratiquée par injection en plusieurs points d'un même muscle de façon à concerner un très grand nombre de plaques motrices. Ce mode de réalisation est particulièrement efficace lorsque le point d'insertion du nerf dans le muscle considéré n'est pas identifiable. Lorsque le point d'insertion du nerf est repérable, l'administration est avantageusement réalisée par une ou plusieurs injections au niveau ou proche(s) dudit point. Selon ce mode de réalisation, l'efficacité du transfert est plus grande car une proportion élevée de vecteur administrée est absorbée au niveau de la jonction neuromusculaire.

Dans un premier mode préféré de mise en oeuvre de la présente invention, l'administration intramusculaire est réalisée par injections en plusieurs points d'un même muscle.

Dans un autre mode préféré de mise en oeuvre de la présente invention, l'administration intramusculaire est réalisée par injection(s) au niveau ou proche(s) du point d'insertion du nerf.

Selon un objet particulier, l'invention concerne l'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires cervicaux par administration dans les muscles des membres supérieurs (exemple : biceps, triceps).

Selon un autre objet particulier, l'invention concerne l'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires thoraciques par administration dans les muscles du thorax (ex. pectoraux).

Toujours selon un objet particulier, l'invention concerne l'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires lombaire et/ou sacré par administration dans les muscles des membres inférieurs (gastrocnémien par exemple).

La méthode selon l'invention peut être mise en oeuvre en utilisant des adénovirus d'origine diverses. Différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont en effet été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 (souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple).

Selon un mode particulier de réalisation préféré de l'invention, l'adénovirus utilisé est un adénovirus d'origine humaine. Selon un autre mode avantageux, l'adénovirus est un adénovirus d'origine animale.

Le génome des adénovirus comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 (E1a et E1b notamment) sont nécessaires à la réplication virale. Les régions E4 et L5 par exemple sont elles impliquées dans la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Les génomes de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genebank M73260). De même des parties, voire la totalité du génome d'adénovirus de sérotypes différents (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées. Les vecteurs adénoviraux utilisés pour la mise en oeuvre de la présente invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et l'acide nucléique d'intérêt.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le génome de l'adénovirus utilisé est dépourvu de tout ou partie de la région E1. La région E1 est en effet essentielle à la réplication virale et son inactivation conduit à la formation de virus défectifs pour la réplication, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome dans les cellules infectées. La région E1, ou tout autre région virale considérée, peut être rendue non fonctionnelle par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou

plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. Avantageusement, le génome de l'adénovirus utilisé est dépourvu d'une partie de la région E1 correspondant aux résidus 454 à 3328 (fragment PvuII-BglIII) ou 382 à 3446 (fragment HinfII-Sau3A).

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le génome de l'adénovirus utilisé est également dépourvu de tout ou partie de la région E3 et/ou E4. La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des vecteurs portant ces différents types de délétions. Ces délétions supplémentaires permettent d'accroître la sécurité du vecteur et d'augmenter sa capacité.

L'acide nucléique d'intérêt peut être inséré en différents sites du génome de l'adénovirus. Avantageusement, il est inséré au niveau de la région E1, E3 ou E4. Cependant, il est clair que d'autres sites peuvent être utilisés. En particulier, l'accès à la séquence nucléotidique du génome permet à l'homme du métier d'identifier ou de créer des sites de restriction utilisables à cet effet.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN d'intérêt. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %).

Une première méthode consiste à transfecter l'ADN du virus recombinant (défectif) préparé in vitro dans une lignée cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la complémentarité du virus défectif. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées dans le génom de la cellule, ce qui réduit les risques de recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire. Dans le cas

d'adénovirus dans lesquels seule la région E1 est déficiente, la lignée préférée est la lignée 293.

Une seconde approche consiste à co-transfecter dans une lignée cellulaire appropriée l'ADN du virus recombinant déficient préparé *in vitro* et l'ADN d'un ou de plusieurs virus ou plasmide helper. Selon cette méthode, il n'est pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de compléter toutes les fonctions défectives de l'adénovirus recombinant. Une partie de ces fonctions est en effet complétée par le ou les virus helper. Ce ou ces virus helper sont eux-mêmes défectifs.

Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR93/05954 et FR93/08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Pour leur utilisation selon la présente invention, les adénovirus sont préférentiellement associés à un ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses de virus utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du site (muscle) d'administration considéré, du nombre d'injections, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Le procédé selon la présente invention est particulièrement avantageux pour le traitement des traumatismes médullaires ou des maladies de dégénérescence motoneuronale. Les traumatismes médullaires correspondent plus particulièrement à des sections au niveau des motoneurons qui les privent de leurs afférences provenant des

centres supérieurs et entraînent leur dégénérescence. Le transfert de gènes codant des facteurs de croissance dans les motoneurones sous lésionnels par transport rétrograde selon l'invention offre maintenant la possibilité de réduire voire empêcher cette dégénérescence. S'agissant de neuropathies du motoneurone, on peut citer par exemple la sclérose latérale amyotrophique, les amyotrophies spinales de type I (maladie de Werdnig Hoffman) de type II ou III (maladie de Kugelberg-Welander), les amyotrophies spinales bulbaires (telles que la maladie de Kennedy). Le transfert de gènes codant pour des facteurs de croissance ou autres molécules connues pour exercer un effet neurotrophique sur le motoneurone en dégénérescence selon la présente invention offre également une nouvelle voie pour le traitement de ce type de pathologies. L'efficacité du procédé de l'invention peut en particulier être mise en évidence sur modèle animaux : modèle de section partielle ou complète de la moelle épinière, souris Wobbler (modèle animal d'étude de la sclérose latérale amyotrophique (Leestma J. E., Am. J. Pathol., 100, 821-824)); souris mnd ("motoneurone degeneration" : modèle animal d'étude de la sclérose latérale amyotrophique (Messer et al., 1992, Genomics, 18, 797-802)) ou souris pmn ("progressive motoneurone neuropathy" : modèle animal d'étude de la dégénérescence motoneuronale lors du développement), comme illustré dans les exemples. L'incorporation, la tolérance et l'inocuité pour l'homme peuvent être testés sur des modèles *in vitro* de culture de neurones médullaires embryonnaires humains.

A cet égard, l'acide nucléique d'intérêt incorporé dans les vecteurs adénoviraux selon l'invention code préférentiellement pour une substance neuroactive, c'est-à-dire capable d'exercer un effet bénéfique sur les cellules nerveuses. Il peut s'agir d'une substance capable de compenser un déficit en ou de réduire un excès d'une substance endogène, ou également d'une substance conférant aux cellules des propriétés nouvelles. Il peut s'agir plus particulièrement d'un facteur de croissance, d'un facteur neurotrophique, d'une cytokine, d'un neurotransmetteur ou encore d'une enzyme, ou d'un récepteur de neurotransmetteur ou d'hormone.

Préférentiellement, parmi les facteurs de croissance, on peut citer les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, CSF, etc), ou les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFa, FGFb) ou des cellules vasculaires (VEGF). Parmi les facteurs neurotrophiques, les facteurs préférés sont notamment le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), les facteurs de maturation des cellules gliales (GMFa,b) le GDNF, le BDNF, le NT3, le NT5, etc. Les cytokines préférées sont les interleukines et les interférons et, parmi les enzymes, on utilise préférentiellement les enzymes de biosynthèse de neurotransmetteurs (tyrosine hydroxylase, acétyl choline transférase,

glutamic acide décarboxylase), les enzymes lysosomales (héxosaminidases, arylsulfatase, glucocérébrosidase, HGPRT), les enzymes impliqués dans la détoxification des radicaux libres (superoxyde dismutase I, II ou III, catalase, glutathion peroxydase). Parmi les récepteurs, on utilisera entre autres les récepteurs aux androgènes (impliqués dans la maladie de Kennedy).

Ces différents facteurs peuvent être utilisés sous forme native, ou sous forme de variant ou fragment ayant une activité de même type.

Il est également possible de transférer des séquences antisens.

L'acide nucléique peut être d'origine naturelle ou artificielle. Il peut s'agir notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire (ADNc), de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Il peut être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Il peut être obtenu par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Il s'agit préférentiellement d'ADNc ou d'ADNg.

Généralement, l'acide nucléique comprend également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans les motoneurons, ainsi qu'une région située en 3' du gène d'intérêt, et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire (promoteurs GFAP, enolase, etc). Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique hétérologue ne comporte pas de séquences promotrices, il peut être inséré dans le génome du virus en aval d'une telle séquence.

La présente invention a également pour objet une méthode pour le transfert d'acides nucléiques dans les motoneurones comprenant l'administration musculaire d'un vecteur adénoviral incorporant ledit acide nucléique dans son génome. Préférentiellement, la méthode selon l'invention est réalisée par injection(s) en plusieurs points d'un même muscle ou, lorsque le point d'insertion du nerf est repérable, par une ou plusieurs injections au niveau ou proche(s) dudit point.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

FIGURE 1 (PHOTO A):

Marquage β -Galactosidase de coupes longitudinales (50 μ m) de moelle épinière de rat au niveau lombaire, après injection intramusculaire d'adénovirus β -Galactosidase dans le muscle gastrocnémien.

- marquage diffus de nombreux corps cellulaires motoneuronaux (Δ).

- marquage plus intense de quelques motoneurones au niveau du corps cellulaire et des neurites, mettant en évidence la morphologie typique des motoneurones (\blacktriangle).

FIGURE 2 (PHOTO B): idem A, grossissement supérieur.

Marquage β -Galactosidase de coupes longitudinales (50 μ m) de moelle épinière de rat au niveau lombaire, après injection intramusculaire d'adénovirus β -Galactosidase dans le muscle gastrocnémien.

FIGURE 3 (PHOTO C):

Co-marquage β -Galactosidase-Immunocytochimie "Calcitonin Gene Related Peptide" (CGRP) de coupes longitudinales (50 μ m) de moelle épinière de rat au niveau lombaire, après injection intramusculaire d'adénovirus β -Galactosidase dans le muscle gastrocnémien.

Exemples

1. Injection de l'adénovirus β -Galactosidase dans le muscle gastrocnémien chez le rat intact ou chez le rat ayant subi une hémisection thoracique de la moelle épinière.

Cet exemple décrit le transfert du gène b-gal au niveau des motoneurones lombaires par administration dans le muscle gastrocnémien d'un adénovirus incorporant ledit gène.

Plus particulièrement, l'étude a été réalisée sur un modèle de section partielle ou
5 complète de la moelle épinière de rat pratiquée au niveau thoracique bas ayant pour effet de paralyser l'animal pour l'un ou ses deux membres inférieurs. Une telle section prive les motoneurones de leurs afférences provenant des centres supérieurs et en entraîne la dégénérescence. L'administration a été réalisée de manière à infecter les motoneurones sous lésionnels par transport rétrograde.

10 Le vecteur adénoviral utilisé dans cet exemple est le vecteur Ad.RSV.βgal. Ce vecteur est dépourvu des séquences nécessaires à sa réplication, mais comporte néanmoins les séquences nécessaires pour pénétrer dans les cellules infectables par celui-ci ainsi que l'ensemble des séquences essentielles nécessaires à l'encapsulation de cet adénovirus. Il porte également, sous le contrôle du promoteur RSV, le gène de la β
15 galactosidase de E.coli. La construction de l'adénovirus recombinant défectif Ad.RSVβgal a été décrite dans la littérature (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626). Brièvement, l'adénovirus Ad.RSVβGal est un adénovirus recombinant défectif (déléte des régions E1 et E3) obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-d1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le
20 plasmide pAd.RSVβGal (Akli et al. 1993).

Le plasmide pAd.RSVβGal contient, dans l'orientation 5'→3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsulation et l'amplificateur E1A;

- 25 - le gène codant pour la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),

- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSVβGal et l'adénovirus d1324.

Après linéarisation par l'enzyme ClaI, le plasmide pAd.RSVβGal et l'adénovirus
30 d1324 sont co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ
35 10¹⁰ pfu/ml. Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient

de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus a ensuite été utilisé sous forme purifiée dans une solution saline phosphate (PBS).

Trois injections d'adénovirus Ad-RSV-b-Gal (10^7 pfu par injection) ont été pratiquées dans le muscle gastrocnémien, juste après que l'animal ait subi (ou pas) une hémisection de la moelle épinière (niveau thoracique bas, ayant pour effet de paralyser l'animal pour l'un de ses membres inférieurs). 9 μ l d'adénovirus sont injectés par point d'injection à la seringue Hamilton.

Les animaux ont été sacrifiés (perfusion 4% paraformaldéhyde) quatre jours après injection, temps minimum pour que le transport rétrograde s'effectue du muscle à la moelle épinière. Trois blocs de moelle épinière ont été coupés longitudinalement aux niveaux cervical, thoracique et lombaire, en coupes de 50 mM d'épaisseur. Les coupes ont été traitées pour la révélation de la β -Galactosidase permettant de mettre en évidence les cellules ayant été infectées par le virus. Certaines coupes ont de plus subi une immunocytochimie anti-"Calcitonin Gene Related Peptide" (CGRP), permettant de marquer spécifiquement les motoneurones.

La β -Galactosidase a été révélée à partir de son substrat, le X-Gal, et le produit de la réaction donne une coloration bleue.

Le "Calcitonin Gene Related Peptide", CGRP, est un neurotransmetteur, marqueur spécifique des motoneurones. Il est révélé par immunocytochimie avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et comme substrat de l'enzyme la diaminobenzidine; le produit de la réaction donne une coloration marron.

La révélation de la β -Galactosidase a permis de mettre en évidence la présence de motoneurones infectés, exclusivement au niveau lombaire, sous lésionnel dans le cas des rats hémisectionnés, et du côté correspondant à l'injection.

Deux types de marquage ont été obtenus, un marquage diffus du corps cellulaire d'un grand nombre de motoneurones, et un marquage plus intense du corps cellulaire et des neurites d'un nombre plus limité de motoneurones (photos A et B). Cette différence d'intensité de marquage est probablement due au fait que seulement quelques motoneurones, très proches du site d'injection, ont pu absorber le virus de façon intense.

L'immunocytochimie anti-CGRP couplée à la révélation β -Galactosidase a permis de mettre en évidence par une double coloration que la quasi totalité des corps cellulaires CGRP positifs (i.e. motoneurones) étaient infectés par le virus (photo C).

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires cervicaux par administration dans les muscles des membres supérieurs (exemple : biceps, triceps).
2. Utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires thoraciques par administration dans les muscles du thorax (ex. pectoraux).
3. Utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant dans son génome un acide nucléique d'intérêt pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires lombaire et/ou sacré par administration dans les muscles des membres inférieurs (gastrocnémien par exemple).
4. Utilisation d'un adénovirus recombinant dont le génome est dépourvu de tout ou partie de la région E1 et de tout ou partie de la région E3 et/ou E4, comprend un acide nucléique d'intérêt, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au transfert dudit acide nucléique dans les motoneurones médullaires par administration intramusculaire.
5. Utilisation selon l'une quelconques des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus d'origine humaine.
6. Utilisation selon l'une quelconques des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus d'origine animale.
7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique d'intérêt est inséré dans le génome de l'adénovirus au niveau de la région E1, E3 ou E4.
8. Utilisation selon l'une quelconques des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'acide nucléique d'intérêt code pour une substance neuroactive.

9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique d'intérêt code pour un facteur de croissance, un facteur neurotrophique, une cytokine, un neurotransmetteur ou une enzyme, ou un récepteur.

5 10. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend en outre des signaux permettant l'expression de la substance neuroactive dans les motoneurones.

11. Utilisation selon l'une quelconques des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'administration intramusculaire est réalisée par injections en plusieurs points d'un même muscle.

1/3



Figure 1

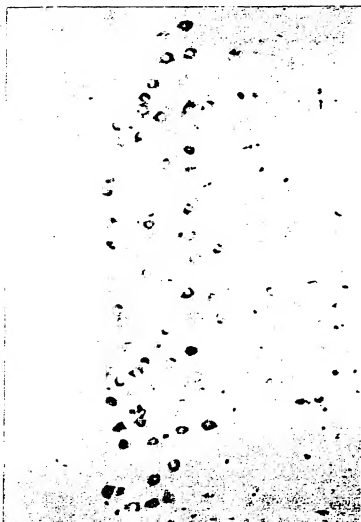


Figure 3



Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC1/FR 95/01650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K48/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

| | | |
|-----|---|---------|
| X | CURRENT OPINION IN NEUROLOGY, vol. 7, no. 5, 7 September 1994 pages 463-478, COOVERT, D.D. ET AL. 'Gene therapy for muscle diseases' see page 466, column 1, paragraph 2 --- | 1-4 |
| P,X | JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 73, no. 4, 1995 BERLIN BDR, pages 165-188, ACSADI, G. ET AL. 'Adenovirus-mediated gene transfer into striated muscles' see page 174, paragraph 2 see page 173, column 2, paragraph 2 --- | 2,3,8,9 |

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
'E' earlier document but published on or after the international filing date
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
'A' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 1996

Date of mailing of the international search report

26.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 3818 Patentkanal 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 631 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/FR 95/01650

| C.(Commission) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | NEUROREPORT, vol. 5, no. 9, 9 May 1994 pages 1069-1072, LISOVOSKI, F. ET AL. 'In vivo transfer of e marker gene to study motoneuronal development' see the whole document --- | 8 |
| A | BRAIN RESEARCH, vol. 648, no. 1, 1994 pages 171-175, RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' see the whole document --- | 4 |
| A | SCIENCE, vol. 259, 12 February 1993 LANCASTER, PA US, pages 988-990, LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' see the whole document --- | 4 |
| P,A | EXPERIENTIA, vol. 51, February 1995 BASEL CH, page A9 GIGER, R.J. ET AL. 'Ectopic expression of the axon-associated cell adhesion molecule axonin-1 in motoneurons, using a defective recombinant adenovirus' Abstract 503-29 --- | 8 |
| P,A | NEUROREPORT, vol. 6, no. 1, 30 December 1994 pages 49-53, HORELLOU, P. ET AL. 'Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease' see page 50, column 1, paragraph 3 --- | 4 |
| A | NATURE GENETICS, vol. 3, no. 3, March 1993 pages 219-223, DAVIDSON, B.L. ET AL. 'A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector' see page 219, column 2, paragraph 3 - page 210, column 2, paragraph 2 --- | 4 |
| A | WO,A,94 08026 (RHONE-POULENC RORER) 14 April 1994 see the whole document --- | 8-10 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.

PCT/FR 95/01650

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | EP,A,0 586 076 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION) 9 March 1994 see claim 1 --- | 4 |
| A | WO,A,93 07270 (GENENTECH INC.) 15 April 1993 see claims --- | 8,9 |
| P,A | WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER) 26 January 1995 see claims 1-5,9,12,13,17,28-30 --- | 8,9 |
| P,A | WO,A,95 00655 (MC MASTER UNIVERSITY) 5 January 1995 see the whole document --- | 4 |
| P,X | GENE THERAPY, vol. 2, no. 2, March 1995 pages 132-137, GHADGE, G.D. ET AL. 'CNS gene delivery by retrograde transport of recombinant replication-defective adenoviruses' see the whole document ----- | 3-5,8-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 95/01658

167718 33761030

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| W0-A-9408026 | 14-04-94 | AU-B- 4818093 CA-A- 2145535 EP-A- 0669987 FI-A- 951404 NO-A- 951121 | 26-04-94 14-04-94 06-09-95 24-03-95 23-03-95 |
| EP-A-0586076 | 09-03-94 | AU-B- 4446593 CA-A- 2101463 FI-A- 933495 HU-A- 67302 JP-A- 6165689 | 10-02-94 08-02-94 08-02-94 28-03-95 14-06-94 |
| W0-A-9307270 | 15-04-93 | CA-A- 2119580 EP-A- 0607247 JP-T- 7501934 | 15-04-93 27-07-94 02-03-95 |
| W0-A-9502697 | 26-01-95 | FR-A- 2707664 FR-A- 2718749 AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 NO-A- 950939 PL-A- 308122 | 20-01-95 20-10-95 13-02-95 26-01-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 10-03-95 24-07-95 |
| W0-A-9500655 | 05-01-95 | AU-B- 7118494 | 17-01-95 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. Internationale No
PC1/FR 95/01650

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation manuelle consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation manuelle dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| X | CURRENT OPINION IN NEUROLOGY, vol. 7, no. 5, 7 Septembre 1994 pages 463-470, COOVERT, D.D. ET AL. 'Gene therapy for muscle diseases' voir page 466, colonne 1, alinéa 2 --- | 1-4 |
| P,X | JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 73, no. 4, 1995 BERLIN BDR, pages 165-180, ACSADI, G. ET AL. 'Adenovirus-mediated gene transfer into striated muscles' voir page 174, alinéa 2 voir page 173, colonne 2, alinéa 2 --- -/- | 2,3,8,9 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' documents définissant l'état général de la technique, non considérés comme particulièrement pertinents
- 'E' documents antérieurs, mais publiés à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' documents pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' documents se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' documents publiés avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' documents ultérieurs publiés après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinents, mais cités pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' documents particulièrement pertinents; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' documents particulièrement pertinents; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est antérieur à lui ou présente autres documents de même nature, cette constatation étant évidente pour une personne du métier
- 'Z' documents qui font partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26.03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patristaan 2
NL - 2220 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-3040, Tlx. 71 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Dem Internationale No
 PC1/FR 95/01650

| C.(name) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|--|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | NEUROREPORT, vol. 5, no. 9, 9 Mai 1994 pages 1069-1072, LISOVOSKI, F. ET AL. 'In vivo transfer of e marker gene to study motoneuronal development' voir le document en entier --- | 8 |
| A | BRAIN RESEARCH, vol. 648, no. 1, 1994 pages 171-175, RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' voir le document en entier --- | 4 |
| A | SCIENCE, vol. 259, 12 Février 1993 LANCASTER, PA US, pages 988-990, LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' voir le document en entier --- | 4 |
| P,A | EXPERIENTIA, vol. 51, Février 1995 BASEL CH, page A9 GIGER, R.J. ET AL. 'Ectopic expression of the axon-associated cell adhesion molecule axonin-1 in motoneurons, using a defective recombinant adenovirus' * Résumé S03-29 * --- | 8 |
| P,A | NEUROREPORT, vol. 6, no. 1, 30 Décembre 1994 pages 49-53, HORELLOU, P. ET AL. 'Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease' voir page 50, colonne 1, alinéa 3 --- | 4 |
| A | NATURE GENETICS, vol. 3, no. 3, Mars 1993 pages 219-223, DAVIDSON, B.L. ET AL. 'A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector' voir page 219, colonne 2, alinéa 3 - page 210, colonne 2, alinéa 2 --- | 4 |
| A | WO,A,94 08026 (RHONE-POULENC RORER) 14 Avril 1994 voir le document en entier --- -/-- | 8-10 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dev Internationale No
PCT/FR 95/01650

C(nom) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| A | EP,A,0 586 076 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION) 9 Mars 1994 voir revendication 1 --- | 4 |
| A | WO,A,93 07270 (GENENTECH INC.) 15 Avril 1993 voir revendications --- | 8,9 |
| P,A | WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER) 26 Janvier 1995 voir revendications 1-5,9,12,13,17,28-30 --- | 8,9 |
| P,A | WO,A,95 00655 (MC MASTER UNIVERSITY) 5 Janvier 1995 voir le document en entier --- | 4 |
| P,X | GENE THERAPY, vol. 2, no. 2, Mars 1995 pages 132-137, GHADGE, G.D. ET AL. 'CNS gene delivery by retrograde transport of recombinant replication-defective adenoviruses' voir le document en entier ----- | 3-5,8-10 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Mentions relatives au nombre de familles de brevets

Der Internationale No
PCT/FR 95/01650

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevets(s) | Date de publication | |
|---|------------------------|--|------------------------|----------|
| WO-A-9408026 | 14-04-94 | AU-B- | 4818093 | 26-04-94 |
| | | CA-A- | 2145535 | 14-04-94 |
| | | EP-A- | 0669987 | 06-09-95 |
| | | FI-A- | 951484 | 24-03-95 |
| | | NO-A- | 951121 | 23-03-95 |
| ----- | | | | |
| EP-A-0586076 | 09-03-94 | AU-B- | 4446593 | 10-02-94 |
| | | CA-A- | 2101463 | 08-02-94 |
| | | FI-A- | 933495 | 08-02-94 |
| | | HU-A- | 67302 | 28-03-95 |
| | | JP-A- | 6165689 | 14-06-94 |
| ----- | | | | |
| WO-A-9307270 | 15-04-93 | CA-A- | 2119580 | 15-04-93 |
| | | EP-A- | 0607247 | 27-07-94 |
| | | JP-T- | 7501934 | 02-03-95 |
| ----- | | | | |
| WO-A-9502697 | 26-01-95 | FR-A- | 2707664 | 20-01-95 |
| | | FR-A- | 2718749 | 20-10-95 |
| | | AU-B- | 7264694 | 13-02-95 |
| | | CA-A- | 2144040 | 26-01-95 |
| | | CZ-A- | 9500639 | 15-11-95 |
| | | EP-A- | 0667912 | 23-08-95 |
| | | FI-A- | 951138 | 13-04-95 |
| | | NO-A- | 950939 | 10-03-95 |
| | | PL-A- | 308122 | 24-07-95 |
| ----- | | | | |
| WO-A-9500655 | 05-01-95 | AU-B- | 7118494 | 17-01-95 |
| ----- | | | | |